

## miR-335 启动子活性鉴定及药物干预

陈璇<sup>1</sup>, 朱璐<sup>1</sup>, 徐凛峰<sup>2</sup>, 汪悦<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>南京中医药大学护理学院, 江苏 南京 210023; <sup>2</sup>南京医科大学第二附属医院普外科, 江苏 南京 210011; <sup>3</sup>南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 目的:探讨 miR-335 上游片段是否具有转录活性以及罗格列酮和胰岛素对 miR-335 启动子区域转录活性的影响。方法:利用 PCR 技术克隆位于 MEST 内含子中 miR-335 上游区域的不同片段,采用双荧光素酶报告基因系统鉴定其转录活性。使用 1 μmol/L 的罗格列酮及不同浓度的胰岛素进行干预并观察转录活性有无变化。结果:不同的 miR-335 启动子区域转录活性不同,在 miR-335 上游约 600 个碱基区域活性最高。未使用药物干预组细胞中,miR-335 启动子区域活性的表达与基础值相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ );使用 1 μmol/L 罗格列酮干预后,miR-335 启动子区域活性显著升高( $P < 0.01$ ),使用 10~12 mol/L 的胰岛素干预时,启动子活性升高,但当胰岛素浓度上升后,启动子活性变化并没有统计学差异。结论:miR-335 上游约 600 个碱基为启动子关键区域,同时,miR-335 有可能通过自身的转录调控机制参与肥胖与胰岛素抵抗的发生发展。

**[关键词]** microRNA-335;启动子;罗格列酮;胰岛素

**[中图分类号]** R589

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)01-022-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20150105

## Identification and intervention of promoter regions of miR-335

Chen Xuan<sup>1</sup>, Zhu Lu<sup>1</sup>, Xu Linfeng<sup>2</sup>, Wang Yue<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Nursing, NJUCM, Nanjing 210023; <sup>2</sup>Department of Suregery, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; <sup>3</sup>the First Clinical Medical College of NJUCM, Nanjing 210023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore whether miR-335 has its own transcription unit and effects of rosiglitazone and insulin on transcriptional activity of MiR-335 promoter regions. **Methods:** We cloned different fragments from upstream sequences of miR-335 in MEST intron by PCR. Then, the luciferase activity of these different plasmids was detected by dual-luciferase reporter system. After the stimulation of 1 μmol/L rosiglitazone and insulin of different concentration, the transcriptional activity change of fragments from upstream sequences of miR-335 was examined. **Results:** Different miR-335 promoter regions had different transcription activity, and the region of about 600 basic groups in miR-335 upstream exhibited the highest activity. The activity of miR-335 promoter in untreated HEK293T cells showed no statistical significance compared to the baseline value. The levels of miR-335 promoter activity showed significant elevation after the intervention of 1 μmol/L rosiglitazone( $P < 0.01$ ). The activity of miR-335 promoter was a little elevated with the stimulation of 10-12 mol/L insulin( $P < 0.05$ ). Meanwhile, the levels of miR-335 promoter activity had no statistical significance when the concentration of insulin increased. **Conclusion:** About 600 basic groups in miR-335 upstream were major promoter regions. Meanwhile, miR-335 may play an important role in the development of obesity and insulin resistance via its own transcription mechanism.

**[Key words]** miRNA-335; promoter; rosiglitazone; insulin

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(01):022-025]

近年来,miRNA 的作用引起许多研究者关注。miRNA 是真核生物体内对基因进行转录后水平调

控的非编码单链小分子 RNA,调控着人类近 1/3 基因的功能<sup>[1]</sup>,几乎参与一切重要的生命活动过程。miRNA 在肥胖、糖尿病发生过程中的作用近年来也开始渐有报道<sup>[2]</sup>,研究发现 miRNA 不仅涉及调节脂肪的形成与代谢,而且与肥胖发生也密切相关<sup>[3]</sup>。已

**[基金项目]** 江苏省高校自然科学基金(12KJD360001)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:wangyuephd@126.com

有研究表明,miR-335 与脂质聚集、脂肪细胞分化密切相关,并随着 3T3-L1 脂肪细胞的分化其表达量上升<sup>[4]</sup>。前期研究中,我们也发现在脂肪细胞分化的过程中,miR-335 的表达明显升高。但是 miR-335 在肥胖发生过程中所发挥的具体作用尚不清楚。研究发现,在 2 型糖尿病的 Goto-Kakizaki 大鼠模型中,miR-335 的表达与胰岛素分泌相关,其在胰岛中呈现高表达状态<sup>[5]</sup>,提示在肥胖中,miR-335 与肥胖相关的胰岛素抵抗可能具有一定的联系。

同时研究表明,相当一部分基因内 miRNA 也拥有独立的转录元件<sup>[6]</sup>。目前有关 miRNA 转录调控研究并不多,可能与研究者注意力过于关注其下游有关。miR-335 位于 7q32 的 MEST 基因的内含子区域,查阅文献发现对 miR-335 转录调控机制的研究极少,因此成为本次研究所关注的重要内容。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

HEK293T 细胞购于美国模式菌种收集中心(Manassas 公司,美国),双荧光素酶报告基因检测试剂盒、pGL3-basic、pRL-TK(Promega 公司,美国),Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国)。罗格列酮(rosiglitazone,ROS)及胰岛素(insulin,INS)购于美国 Sigma 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 构建不同长度的 miR-335 上游序列荧光素酶报告基因

查询 miRBase 数据库获得 hsa-miR-335 的序列,在 NCBI map viewer 查找其所在的基因组序列,下载 miR-335 上游的约 3 000 个碱基序列。并将其下载的上游序列分成 3 段(P1、P2 和 P3),之后又将 P3 分为独立的 2 个片段(P4 和 P5)。根据引物设计原则,以人基因组 DNA 为模板,采用 Primer 5 软件设计扩增其不同长度的上游片段,并在扩增片段的上游和下游分别引入限制性酶切位点(*Hind* III, *Xho* I),设计的引物片段交由 Invitrogen 公司人工合成。将目的片段与 pGL3-basic 分别进行双酶切后使用 T4 连接酶连接,构建荧光素酶报告基因。

#### 1.2.2 细胞培养与质粒转染

HEK293T 细胞置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,培养基为含 10%胎牛血清、1%青链霉素的 DMEM 完全培养基,根据细胞生长情况每 2~3 d 换液 1 次。当细胞处于对数生长期时,将细胞接种至 48 孔培养板,每孔约 2×10<sup>4</sup> 个细胞。细胞长至 60%~70%

时,使用 Lipofectamine 2 000 每孔共转染 250 ng 启动子荧光素酶报告质粒与 25 ng 海肾荧光素酶载体(pRL-TK),6 h 后更换细胞培养基。37℃培养箱中继续培养后进行检测。

#### 1.2.3 药物干预

接种 HEK293T 细胞至 48 孔培养板,每孔约 2×10<sup>4</sup> 个细胞。细胞长至 40%~50%时,更换细胞培养基为不含 FBS 的空 DMEM,饥饿细胞 12 h。分别加入不同的药物(1 μmol/L 的 ROS<sup>[7]</sup>、10<sup>-12</sup>、10<sup>-11</sup>、10<sup>-10</sup> mol/L INS<sup>[8]</sup>)干预细胞,12 h 后更换培养基并转染 P3-pGL3-basic 质粒,分别设 pGL3-basic 空载组及不加药物组为对照。6 h 后将培养基更换为细胞全培养基。48 h 后去除细胞培养液,测定荧光素酶活性。

#### 1.2.4 荧光素酶活性测定

使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定。细胞转染 48 h 后去除细胞培养液,PBS 清洗 2 次,弃去。每孔加入 65 μl 的裂解液(1×PLB),在室温下轻轻晃动培养板 15 min,被动裂解细胞。将裂解液转移到 1.5 ml 的离心管中,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。将离心后的上清转移到新的 200 μl 小离心管内,设定发光仪(Turner Biosystems)程序。将 1.5 ml 离心管中加入 100 μl LAR II 反应液,取 20 μl 的裂解液上清与其充分混匀,放入发光仪内测定读取萤火虫荧光素酶活性。读取萤火虫荧光素酶活性结束后,加入 100 μl stop & Glo 反应液,充分混匀后,于发光仪中读取海肾荧光素酶(RL)活性。以 RL 活性为内对照,分析荧光素酶的相对活性。每次转染重复 3 孔,实验重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

使用 SPSS16.0 软件进行数据分析,各组数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析。 $P \leq 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 荧光素酶报告基因的鉴定

以 miR-335 序列为标志点,处于其相邻上游的第 1 个碱基标记为-1 bp,双酶切后构建了 5 个不同的长度的 miR-335 上游序列荧光素酶报告基因(图 1)。经酶切鉴定(图 2)及质粒测序鉴定均正确。

### 2.2 不同长度的 miR-335 上游序列荧光素酶报告基因的活性

以 pGL3-Basic 空载为参照物时,P3-pGL3-basic 的相对荧光素酶活性最高(图 3)。P1 片段并未表现出启动活性,P2 片段的转录活性稍有升高,但并不明显。在由 P3 分段而成的 P4 与 P5 片段中,P5 (-368~-58)

荧光素酶报告质粒的转录活性更高。

### 2.3 罗格列酮和胰岛素对 miR-335 上游片段荧光素酶活性的影响

由于研究已表明 miR-335 与肥胖及胰岛素分泌的相关性,为了进一步探索 miR-335 启动子与其之间的关系,我们使用了罗格列酮和胰岛素对 HEK293T 细胞进行干预。实验结果表明,未使用药物干预组细胞中,miR-335 启动子区域活性的表达与基础值相比无统计学意义( $P > 0.05$ );使用  $1 \mu\text{mol/L}$  罗格列酮干预后,miR-335 启动子区域活性显著升高( $P < 0.01$ ),使用  $1 \times 10^{-12} \text{ mol/L}$  的胰岛素干预时,启动子活性升高( $P < 0.05$ ,图 4),但当胰岛素浓度上升后,启动子活性变化并没有统计学差异。

### 3 讨论

许多 miRNA 拥有独立的转录元件,这些元件的转录调控可以受许多因素所影响,影响转录调控的因素主要有:DNA 的甲基化与去甲基化、激活因子和抑制因子等相关的转录因子、染色质的乙酰化和去乙酰化等。探讨转录调控对于理解 miRNA 的功能及相关疾病过程具有比较重要的意义。

miR-335 位于 7q32 的 MEST 基因内含子区域,经相关软件和网站预测 miR-335 可能具有独立的转录调控机制。本研究结合以往研究中启动子的预测原则,通过鉴定分析 miR-335 的上游区域,确定了 miR-335 的启动子或增强子序列;这些序列的转录活性可以受罗格列酮、胰岛素因子的影响,提示这些因子可能通过某些机制调控启动子的转录活性,从而干预 miR-335 的表达。

通过 TFSEARCH 网站预测分析发现,转录活性较高的片段(P3、P5)所包含的与肥胖相关的转录因子结合位点较多,如 CdxA、C/EBP、Oct-1、Nkx-2 等。同时,通过对人类一些启动子的分析也发现 CdxA、C/EBP 等转录因子结合位点出现的概率较高<sup>[9-10]</sup>。一些研究也表明 GATA 等转录因子可以通过影响启动子的活性而影响相关基因的表达<sup>[11]</sup>。miR-335 上游区域这些因子出现的概率较高,进一步说明了其与肥胖及并发症的相关性。

研究发现,miR-335 的表达与胰岛素分泌以及肥胖引起的胰岛素抵抗相关<sup>[5,12]</sup>。罗格列酮属于 PPAR- $\gamma$  激动剂,它可以通过改善胰岛素抵抗而达到降低血糖的作用,同时罗格列酮还可以改善脂质

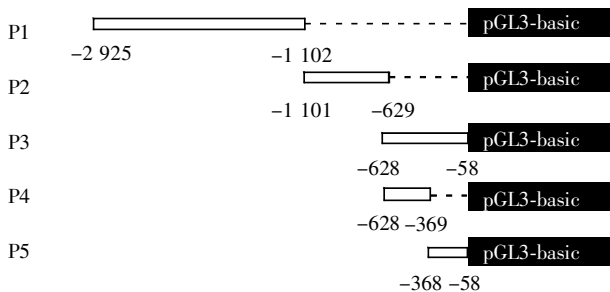


图 1 miR-335 上游序列荧光素酶报告基因构建示意图  
Figure 1 Construction of luciferase reporter assays of miR-335 promoter

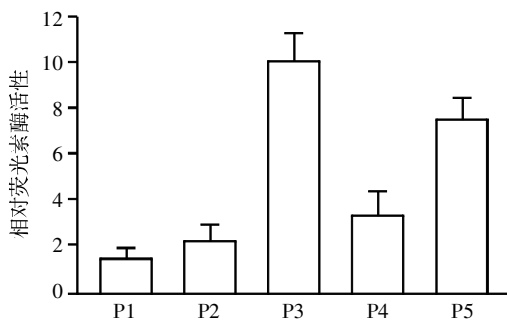
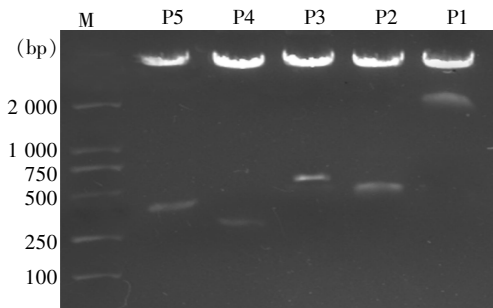
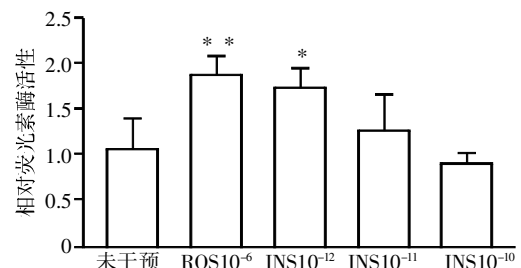


图 3 miR-335 启动子的荧光素酶活性分析  
Figure 3 Luciferase activity analysis of miR-335 promoter



M: DL2000 DNA Marker; P1~P5: PCR 产物, Hind III、Xho I 双酶切。

图 2 miR-335 上游序列荧光素酶报告基因酶切鉴定  
Figure 2 Enzyme digestion of luciferase reporter assays of miR-335 promoter



药物浓度单位为 mol/L,与未干预组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ( $n=9$ )。

图 4 HEK293T 细胞中罗格列酮和胰岛素对 P3 片段转录活性的影响  
Figure 4 Effects of rosiglitazone and insulin on luciferase reporter plasmids activity in HEK293T cells

代谢紊乱、减轻葡萄糖、甘油三酯和游离脂肪酸(FFA)对胰岛  $\beta$  细胞的糖毒性和脂毒性,从而对细胞产生直接与间接保护作用。本研究中,当 HEK293 T 细胞经罗格列酮药物刺激后,转染的 miR-335 启动子活性明显升高,表明罗格列酮可以通过某些机制参与到启动子转录调控过程中。研究表明,PPAR- $\gamma$  激动剂能够选择性地降低抵抗素启动子与 C/EBP 的结合,从而抑制 resistin 表达<sup>[13]</sup>。罗格列酮还能够通过激活 PPAR- $\gamma$ ,减少调控 FFA 转运和氧化的一些基因的表达,影响了脂肪细胞内 FFA 的代谢,从而降低血 FFA 水平<sup>[14]</sup>。这些都说明了罗格列酮可以在调控基因的表达中发挥重要作用。当糖尿病患者口服常规治疗量的罗格列酮后,体内最高的血药浓度为 156~319 ng/ml,即 0.5~1.0  $\mu\text{mol/L}$ ,与本次实验所使用的干预浓度相近,表明在糖尿病患者中,1  $\mu\text{mol/L}$  的罗格列酮可能通过改变 miR-335 启动子活性等机制参与到血糖调控的过程中去。

胰岛素是细胞发挥内分泌功能的重要调节因素,对脂肪细胞内的许多炎症因子分泌也具有调节作用。使用胰岛素干预第 6 天或第 8 天分化成熟的脂肪细胞后,脂肪细胞分泌内脏脂肪素(visfatin)明显增多<sup>[15]</sup>。本研究使用不同浓度的胰岛素干预细胞后,启动子活性变化不同,当使用  $10^{-12}$  mol/L 的胰岛素干预时,启动子活性升高,但当胰岛素浓度上升后,启动子活性变化并没有统计学差异,表明生理水平的胰岛素( $10^{-11}$  mol/L)和高浓度的胰岛素对 miR-335 的启动子活性并不具备一定的调节作用。也可能由于本研究仅使用 HEK293T 工具细胞观察启动子活性,并没有观察药物在脂肪细胞或胰岛细胞中对 miR-335 启动子活性的影响,从而影响药物通过一些肥胖发生或胰岛素分泌相关的信号通路或代谢途径发挥对启动子的调控作用,在以后的研究中可以加强此部分的研究。

本研究初步探讨了 miR-335 的转录调控机制,鉴定了 miR-335 的转录调控区域,发现 miR-335 具有独立的转录机制,为日后 miRNA 组的研究提供了新思路,也为 miRNA 转录调控研究提供了许多重要线索,将有助于更全面、深入理解肥胖相关胰岛素抵抗的机制,为将来的并发症防治奠定基础。

#### [参考文献]

[1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2):281-297  
[2] Tavintharan S, Chi LS, Fang SC, et al. Riboregulators and metabolic disorders: getting closer towards understanding the pathogenesis of diabetes mellitus? [J]. Curr Mol

Med, 2009, 9(3):281-286  
[3] Martinelli R, Nardelli C, Pilone V, et al. miR-519d over-expression is associated with human obesity[J]. Obesity (Silver Spring), 2010, 18(11):2170-2176  
[4] Nakanishi N, Nakagawa Y, Tokushige N, et al. The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(4):492-496  
[5] Esguerra JL, Bolmeson C, Cilio CM, et al. Differential glucose-regulation of microRNAs in pancreatic islets of non-obese type 2 diabetes model Goto-Kakizaki rat[J]. PLoS One, 2011, 6(4):e18613  
[6] Monteys AM, Spengler RM, Wan J, et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters[J]. RNA, 2010, 16(3):495-505  
[7] Montezano AC, Amiri F, Tostes RC, et al. Inhibitory effects of PPAR-gamma on endothelin-1-induced inflammatory pathways in vascular smooth muscle cells from normotensive and hypertensive rats[J]. J Am Soc Hypertens, 2007, 1(2):150-160  
[8] 沈坤堂, 秦新裕, 张 新, 等. 胰岛素、胰高血糖素和地塞米松调节 PEPCK 启动子活性的体外研究[J]. 复旦学报:医学版, 2003, 30(4):338-341  
[9] Xu J, Kawai Y, Arinze IJ. Dual role of C/EBPalpha as an activator and repressor of Galphai2 gene transcription[J]. Genes Cells, 2013, 18(12):1082-1094  
[10] Liu YF, Zan LS, Cui WT, et al. Molecular cloning, characterization and association analysis of the promoter region of the bovine CDK6 gene[J]. Genet Mol Res, 2011, 10(3):1777-1786  
[11] Sun J, He H, Pillai S, et al. GATA3 transcription factor abrogates Smad4 transcription factor-mediated fascin overexpression, invadopodium formation, and breast cancer cell invasion [J]. J Biol Chem, 2013, 288 (52):36971-36982  
[12] Zhu L, Chen L, Shi CM, et al. MiR-335, an adipogenesis-related microRNA, is involved in adipose tissue inflammation[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 68(2):283-290  
[13] Singh AK, Battu A, Mohareer K, et al. Transcription of human resistin gene involves an interaction of Sp1 with peroxisome proliferator-activating receptor gamma(PPAR-gamma)[J]. PLoS One, 2010, 5(3):e9912  
[14] Kim HS, Hwang YC, Koo SH, et al. PPAR-gamma activation increases insulin secretion through the up-regulation of the free fatty acid receptor GPR40 in pancreatic beta-cells[J]. PLoS One, 2013, 8(1):e50128  
[15] 陈小慧, 张 敏, 池 霞, 等. Visfatin 在 3T3-L1 脂肪细胞诱导分化过程中的分泌变化及胰岛素的调节作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(1):48-50